

機関番号： 23803
 研究種目： 基盤研究（C）
 研究期間： 2008～2010
 課題番号： 20590038
 研究課題名（和文）科学的根拠に基づくデザイナードラッグ等違法ドラッグの乱用防止に関する研究
 研究課題名（英文）Scientific research of evidence-based prevention of illegal drug of abuse
 研究代表者
 豊岡 利正（TOYOOKA TOSHIMASA）
 静岡県立大学・薬学部・教授
 研究者番号： 40183496

研究成果の概要（和文）：指定薬物の構造は、フェネチルアミン系、トリプタミン系、ピペラジン系に大別される。初めに比較的安価な装置を用いた指定薬物の一斉分析法の開発を目的として、酸化還元反応を利用した電気化学検出法を開発した。次に、蛍光標識試薬で誘導体化後、HPLCで分離し、質量分析計で検出した。本法は、蛍光標識しているため選択性が向上し、また、質量分析計で検出しているため、高感度で定量できるうえ、微量の未知化合物の定性分析を行うことができ優れた分析法となった。これらの分析法を用いて、市場に出回っていた各種形態の試料を分析し、薬物を特定しその含有量を測定することができた。さらに、フェネチルアミン系乱用薬物を中心とする違法ドラッグ成分のキラル誘導体化法を利用した光学異性体分離法および迅速かつ簡便な一斉分析法の開発を実施した。12種類のフェネチルアミン系違法ドラッグ成分の光学異性体が良好に分離された。本法により、過去に流通していた製品中の分析に適用したところ、フェネチルアミン系乱用薬物成分の各エナンチオマー成分を完全に分離定量できた。

研究成果の概要（英文）：The structures of “designated substances” (Shitei-Yakubutsu) are divided into three types, i.e., phenethylamines, tryptamines and piperadines. Simultaneous determination method using HPLC with multi-channel electrochemical detection was developed for the designated substances. The proposed method utilizing online oxidation was the first report on the simultaneous determination of various designated substances. The simultaneous determination based on UPLC with FL detection and ESI-TOF-MS was also developed for 16 designated substances. However, the determination of several designated substances by FL detection was interfered with endogenous substances. However, the determination in real samples was successfully carried out by a combination of UPLC separation and TOF-MS detection. This method was applied to the analyses of human plasma, urine and real products. Furthermore, the enantioseparation of phenethylamines possessing an asymmetric carbon in the structure was achieved with indirect chiral derivatization method using a chiral reagent, R(-)-DBD-PyNCS. Twelve kinds of phenethylamine derivatives were efficiently separated by reversed-phase HPLC and sensitively detected. The proposed method was successfully applied to the analyses of rat plasma and real products.

交付決定額

（金額単位：円）

	直接経費	間接経費	合計
20年度	1,500,000	450,000	1,950,000
21年度	1,100,000	330,000	1,430,000
22年度	1,100,000	330,000	1,430,000
年度			
年度			
総計	3,700,000	1,110,000	4,810,000

研究分野：分析化学

科研費の分科・細目：薬学・物理系薬学

キーワード：指定薬物・液体クロマトグラフィー・蛍光分析・質量分析・電気化学分析

1. 研究開始当初の背景

近年、麻薬・覚醒剤類の代用として、様々な化学物質や植物が乱用されている。これらの製品はいわゆる「違法ドラッグ」と呼ばれ、健康被害や社会的弊害が懸念されている。違法ドラッグとは、薬事法もしくは麻薬及び向精神薬取締法の規制枠を逃れて販売されているものであり、幻覚作用や興奮作用、多幸感を標榜し、中には実際に麻薬と構造や薬理作用が類似している薬物や麻薬成分を有する植物を含有しているものもある。比較的安価で、繁華街の路上やアダルトショップ、インターネットなどで容易に入手が可能であることから、特に青少年の間で蔓延しており、健康被害も多数報告されている。

厚生労働省では、この深刻化する違法ドラッグ問題に対応するため、平成 18 年に薬事法を改正し、興奮等の作用を有する蓋然性が高く、保健衛生上の危害が発生するおそれがある薬物や植物を厚生労働大臣が「指定薬物」として指定し、医療等の用途以外の製造、輸入、販売等を禁止することになった。この改正をうけて平成 19 年 4 月に 32 種の化学物質（デザイナードラッグ）と 1 種の植物（*Salvia divinorum*）が「指定薬物」として指定された。現在も麻薬や覚醒剤等のように依存性が実証されたものについては、順次「指定薬物」として公表されている。

指定薬物の分析は、地方の衛生研究所を中心とした様々な分析機関で実施されることになるが、分析が迅速に行われるように分析標準品の整備とともに、構造が紛らわしいこれら薬物の識別のための簡易スクリーニング法の開発が必要不可欠である。一般に、違法ドラッグは同一内容成分であっても、商品名や容器、包装形態等を次々に変えて販売されているのみならず、法の目をくぐるために、種々の物質に混在させてわかり難くしていることが多い。また、その成分が規制されてもすぐに化学構造の一部を変化させた薬物（デザイナードラッグ）が合成され流通している。このように試料の多様性や薬物の多様性から、そのスクリーニングには検出感度や特異性が高くハイスループットな分析法が望まれる。さらに、これらの違法ドラッグの裁判化学的な使用証明には、複数の分析法により確実な証拠を提示しなければならないが、一般に薬物摂取後長時間が経過している

場合には代謝され、その検出が極めて困難となる。これまでに報告されている分析法では検出感度や特異性の点で充分とはいえず、市場に出回っている製品中の薬物のスクリーニングはできたとしても、生体試料（尿、血液、唾液、毛髪等）中の検出は極めて困難と推測される。また、その薬物の代謝物質の検出をもって証明することも可能ではあるが、新たに薬物として使われた場合には、代謝物に関する情報もまったくないのが、現状である。

2. 研究の目的

本研究では、上記の指定薬物に関して、高感度度かつ特異的なハイスループットスクリーニング法の開発を行う。また、将来増加すると予想される薬物常用者の使用証明を目的とした、毛髪中の親化合物（薬物そのもの）と代謝物の種類や濃度を尿や血液の結果と比較する。一方、薬物中に混在する異性体や不純物の種類や量を、液体クロマトグラフィー飛行時間型質量分析計（LC-TOF-MS）を用いて網羅的に測定し得られた結果を基に入手経路の特定のための一助とする。

本研究が実施されれば、ドラッグ類の高感度、特異的なハイスループット分析法の開発はもちろんであるが、今後増加が予想される新規なデザイナードラッグの迅速分析に関する情報を提供することができる。また、毛髪、尿、血液等の生体試料の解析から、親化合物と代謝物に関するデータが得られことから、ドラッグ乱用者に対する使用証明を容易に行うことができる。また、光学異性体等の混合比率等の解析から、ドラッグの入手経路や産地を特定できる可能性があり、その結果として、違法薬物乱用防止の一助となる。この種の研究は、厚生行政と深くかかわっており、その成果は広く社会に還元でき、国民の安心・安全、健康維持に寄与するものである。

3. 研究の方法

(1) 高感度度かつ特異的なハイスループットスクリーニング法の開発。

これまでに報告されているドラッグは、フェネチルアミン系、トリプタミン系、ピペラ

ジン系に大別される。従来の分析法としては、液体クロマトグラフィー紫外吸光度計 (LC-UV) が報告されているが、十分な感度と選択性が得られず、生体試料へは適用されていない。本研究では、これらドラッグの構造特異性に着目し、蛍光標識試薬により、適当な官能基を標識し、各系統別に高感度特異的な分析法を確立する。具体的には、フェネチルアミン系およびピペラジン系ドラッグには構造中の1級および2級アミンに着目し、ベンゾフラザン系誘導体化試薬類との反応を実施し、最適な試薬を選択後反応の最適化を行い、ついで LC で分離し蛍光で検出する。また、薬物の構造をより確実に決定するため標識体の LC-MS での測定も同時に実施した。一方、これまで一斉分析法としてガスクロマトグラフィー質量分析法 (GC-MS) があるが、単なる合成品を用いた定性分析のみであり、定量分析および生体試料への応用はされていない。本研究では、比較的安価な装置を用いた一斉分析法の開発を目的として、酸化還元反応を利用した電気化学検出法を検討した。具体的には、LC で分離後クーロアレイ検出器の酸化電位あるいは還元電位を変化させて得られるハイドロオキシボルタングラムから最適電位を決定し、一斉分析を可能とする方法を確立した。これらの分析法を確立した後、市場に出回っていた各種形態の試料を分析し、薬物を特定しその含有量を測定し、確立した方法の有用性を検証した。

(2) 毛髪中の親化合物と代謝物の種類や濃度測定。

薬物常用者の使用証明を目的とし、毛髪中の親化合物と代謝物の構造確認と各代謝物の定量を行った。尿や血液の分析では、薬物使用直後 (通常数日以内) の情報は得られるものの、薬物摂取から日数が経過している場合には、その使用証明が困難である。しかし、毛髪には塩基性の化合物が、比較的長期間良く蓄積されることから、薬物の使用証明ができる。本研究では、毛髪から有機溶媒等で抽出された親化合物とその代謝物を LC-TOF-MS で測定し、血液や尿から得られた結果と比較し、使用証明の適否および本法の問題点を精査した。

(3) LC-MS による、薬物中に混在する光学異性体の測定。

薬物試料には、製造した地域や場所により、薬物を合成した際の不純物や夾雑物の種類や濃度が異なる。また光学異性体を含む薬物であれば、その含有率が異なる。これらの比率を精査することにより、入手ルートの特定の参考となる。

4. 研究成果

本研究では、まず指定薬物のうち、違法ドラッグであるフェネチルアミン系指定薬物 11 種類について高感度蛍光試薬 4-(*N,N*-dimethylaminosulfonyl)-7-fluoro-2,1,3-benzoxadiazole (DBD-F) で標識し、UFLC-FL 法による迅速、高感度な一斉分析法の開発を行った。その結果、8分から25分以内に感度良く、良好に分離することができた。個々の化合物の検量線は良好な直線性を示し、検出限界は 40 fmol \sim 5 pmol 以下であった。次に、指定薬物を蛍光標識化せず、簡便迅速、かつ高感度なスクリーニング法を開発を目的として HPLC-クーロアレイ電気化学検出器 (CAD) による高感度一斉分離検出法を開発を行った。その結果、指定薬物 31 種類を一斉分離検出することができた。また、指定薬物をトリプタミン系、フェネチルアミン系、ピペラジン系を含むその他の3系統にそれぞれ分類し、系統別に良好な分離を達成することができた。個々の指定薬物の最適な酸化電圧における検出限界は 25pg/ml \sim 0.5 μ g/ml であった。続いて、上記の両分析法を用いて、市場で違法ドラッグとして販売されていた3種類の実試料に適用し、分析法の有用性を検証した。

このように我々は、フェネチルアミン系指定薬物の UFLC-FL 法、HPLC-クーロアレイ検出器 (CAD) による指定薬物の高感度一斉分析法を開発してきたが、生体試料への適用では、内因性物質の妨害により分離が困難で、分析時間が長いなどの問題点があった。そこで更に、生体試料に適用可能な迅速かつ高感度なスクリーニング法を開発を目的とし、フェネチルアミン系及びピペラジン系指定薬物 16 種類について UPLC-ESI-TOF-MS 法による一斉分析法の開発を行った。4-(*N,N*-dimethylaminosulfonyl)-7-fluoro-2,1,3-benzoxadiazole (DBD-F) により蛍光標識した 16 種類の指定薬物は、カラムに ACQUITY UPLC BEH C₁₈ (1.7 μ m, 100 mm \times 2.1 mm I.D.)、移動相には 0.1% ギ酸水溶液とアセトニトリル:メタノール (20:80) 混合液を使用することで 8.5 分以内に感度良く、良好に分離することができた。個々の化合物の検量線は良好な直線性を示し、日内・日間変動は 1.69% \sim 12.97% で良好な再現性を示した。また、ヒトの血液・尿に適用したところ、ヒトの 0.1 mL あたりの血漿及び尿での検出限界 (S/N = 3)、定量限界 (S/N = 10) はそれぞれ 0.30 \sim 150 pmol と 1.0 \sim 500 pmol、ヒト血漿での回収率は 87.7% \sim 107.4% であった。

本法は、指定薬物を高感度且つ短時間で一斉分離検出することが可能であるため、違法ドラッグ中指定成分の定性・定量分析及びヒト血液、尿、毛髪等の生体試料への応用が可能と考えられ、薬物乱用者の使用歴の証明に応用できると期待される。

続いて、違法ドラッグ成分の光学異性体分離を含む迅速かつ簡便な一斉分析法を試みた。2009年11月に指定薬物に指定されたジフェニルプロリノール (D2PM) を対象にキラル誘導体化試薬 (*R*)-(-)-DBD-Py-NCS を用いた検討を行ったところ、その光学異性体は ODS カラムを用いて水-メタノールを移動相とした逆相系により良好に分離された。D2PM を投与したラット血漿および毛髪を分析したところ、D2PM のラセミ体を投与した際にはいずれの光学異性体も検出され、また、一方の光学異性体のみを投与した際には、その異性体のみが検出された。さらには、D2PM ばかりでなく、より多数の違法ドラッグ成分の迅速な分析を行うため、超高速液体クロマトグラフィー (UHPLC) を用いた検討を行った。その結果、通常の HPLC 測定と比較して分析時間を大幅に短縮することが可能であり、12種類の違法ドラッグ成分の光学異性体が良好に分離された。さらに、過去に国内の違法ドラッグ市場において流通していた製品中の成分分析に適用したところ、指定薬物である BDB および MMDA-2 が検出された。本研究により開発された手法は、違法ドラッグ中に含まれるフェネチルアミン系乱用薬物成分の分析および違法ドラッグ成分の血液や毛髪などの生体試料中からの検出に適用することが可能であったが、D2PM を投与した実験動物ばかりではなく、薬物乱用者の血液や毛髪などから検出することが可能と考えられ、薬物使用の証明等、様々な目的に利用されることが期待される。

5. 主な発表論文等

(研究代表者、研究分担者及び連携研究者には下線)

[雑誌論文] (計 35 件) すべて査読有

- 1) Shinsuke Inagaki, Sayuri Taniguchi, Haruo Hirashima, Tatsuya Higashi, Jun Zhe Min, Ruri Kikura-Hanajiri, Yukihiko Goda, Toshimasa Toyo'oka: HPLC enantioseparation of α,α -diphenyl-2-pyrrolidinemethanol and methylphenidate using a chiral fluorescent derivatization reagent and its application to the analysis of rat plasma. *J. Sep. Sci.*, 33, 3137-3143 (2010).

- 2) Jun Zhe Min, Kazuhide Yamashita, Toshimasa Toyo'oka, Shinsuke Inagaki, Tatsuya Higashi, Ruri Kikura-Hanajiri, and Yukihiko Goda. Simultaneous and group determination methods for designated substances by HPLC with multi-channel electrochemical detection and their application to real samples. *Biomed. Chromatogr.*, 24, 1287-1299 (2010).
- 3) Shinsuke Inagaki, Hatsune Makino, Takeshi Fukushima, Jun Zhe Min, Toshimasa Toyo'oka, Rapid detection of ketamine and norketamine in rat hair using micropulverized extraction and ultra-performance liquid chromatography-electrospray ionization mass spectrometry. *Biomed. Chromatogr.* 23(12) 1245-1250 (2009).
- 4) 173) Jun Zhe Min, Suguru Hatanaka, Toshimasa Toyo'oka, Shinsuke Inagaki, Ruri Kikura-Hanajiri, Yukihiko Goda, Rapid, sensitive and simultaneous determination of fluorescence-labeled designated substances controlled by the Pharmaceutical Affairs Law in Japan by ultra-performance liquid chromatography coupled with electrospray-ionization time of flight mass spectrometry. *Anal. Bioanal. Chem.* 395(5), 1411-1422 (2009).
- 5) Jun Zhe Min, Yoshiha Shimizu, Toshimasa Toyo'oka, Shinsuke Inagaki, Ruri Kikura-Hanajiri, Yukihiko Goda: Simultaneous determination of 11 designated hallucinogenic phenethylamines by ultra-fast liquid chromatography with fluorescence detection. *J. Chromatogr. B*, 873, 187-194 (2008).

[学会発表] (計 60 件)

- 1) 平島晴生、谷口さゆり、稲垣真輔、東 達也、関 俊哲、豊岡利正、花尻瑠璃、合田幸広：HPLC-蛍光検出による光学異性体を含む指定薬物の一斉分析法の開発。日本病院薬剤師会東海ブロック・日本薬学会東海支部合同学術大会2010 (静岡)、講演要旨集、p. 123、2010年11月28日
- 2) 平島晴生、谷口さゆり、稲垣真輔、東 達也、関 俊哲、豊岡利正、花尻瑠璃、合田幸広：Diphenyl-2-pyrrolidine methanolおよびmethylphenidateの光学異性体分離、第17回クロマトグラフィーシンポジウム (広島)、講演要旨集、p. 65-66、2010年6月4日
- 3) 山下和秀、関 俊哲、豊岡利正、稲垣真輔、東 達也、花尻瑠璃、合田幸広：HPLC-電気化学検出法を用いたデザイナードラ

- ッグの簡便かつ高感度な分析法の開発、
日本分析化学会第58年会（札幌）、講演要
旨集、p. 86、2009年9月26日
- 4) 山下和秀、関 俊哲、豊岡利正、稲垣真
輔、花尻瑠理、合田幸広：HPLC-クーロア
レイ検出器（CAD）による指定薬物の高
感度一斉分析法の開発、日本薬学会第
129年会（京都）、要旨集4、p. 96、2009
年3月26日
 - 5) 関 俊哲、畠中 俊、豊岡利正、稲垣真
輔、花尻瑠理、合田幸広：UPLC-ESI-TOF-MS
による蛍光標識化指定薬物の高感度迅速
一斉分析法の開発。第19回クロマトグラ
フィー科学会議（京都）、講演要旨集、
p. 63-64、2008年12月2日
 - 6) 関 俊哲、清水芳羽、豊岡利正、稲垣真
輔、花尻瑠理、合田幸広：UFLC-蛍光法に
よるフェネチルアミン系指定薬物の高感
度一斉分離検出法の開発。第15回クロマ
トグラフィーシンポジウム（静岡）、講演
要旨集、p. 135-136、2008年5月31日

[その他]

ホームページ等

<http://w3pharm.u-shizuoka-ken.ac.jp/~analchem/>

6. 研究組織

(1) 研究代表者

豊岡 利正 (TOYOOKA TOSHIMASA)

静岡県立大学・薬学部・教授

研究者番号： 4 0 1 8 3 4 9 6